



四肢における形態的特徴の多様性創出に関する研究

著者	関 亮平
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第15939号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58721

博士論文（要約）

四肢における形態的特徴の多様性創出に関する研究

平成25年度

東北大学大学院生命科学研究科

生命機能科学専攻

関 亮平

序章

本研究では脊椎動物が示す多様な形態に焦点を当て、その要因を追求することを試みた。特に、形態多様化のモデルの1つとして、四足動物の特徴である四肢の形態に着目した。四肢の骨格形態は種間で多様な形態を示すと同時に、その基本的な形態や発生過程で機能する分子メカニズムは種間で高度に保存されている。したがって、各動物の四肢形態は多様化のプロセスを経た結果を示す良い例であるといえる。

形態の多様化を理解するためには、種間比較をおこなうことで形態の違いを把握すると同時に、その違いが生み出される発生過程や、その際に発現する遺伝子の発現動態や機能を把握する必要がある。本研究の第1章と第2章はこれらの側面に焦点を当てたものである。第1章では四肢の骨格形態に着目し、その基本的な形態および発生メカニズムについて言及する。特に、四足動物の中でも鳥類の骨格について詳細に記述し、他種で見られる一般的な四肢骨格形態やその発生過程と比較することで、鳥類の特異性や他種との共通性を議論する。第2章では、四肢骨格要素の中でも指に注目し、その形成機構について解析した結果を述べる。ここでは、ある1つの転写因子の機能解析と発現解析を通じて、“指の形態多様化のメカニズムを考察する上で基礎となる分子メカニズムの解明”に取り組んだ。種間で多様な形態であっても、その原因は基礎となる分子メカニズムに生じた変化であると考えられる。したがって、まずこの基礎を理解しなければならない。

第3章は、形態多様化の原動力となるメカニズムに焦点を当てたものである。近年では、ゲノム上の調節配列（シス配列）の変化が形態多様化にとって最も重要な原動力であると考えられている。第2章で扱う、基礎となる分子メカニズムの変化も最終的にはシス配列の種間差に還元できるはずである。そこで第3章では、第1章で言及する鳥類の四肢に特有の形態に注目し、それらの形態の創出要因がゲノム上のどの配列に起因するのかについて解析した内容を報告する。ここでは複数種の鳥類ゲノムを用いた比較解析を通じて候補となるシス配列の探索をおこなうとともに、各シス配列の標的遺伝子の中から鳥類特異的形態の要因となりうるものを選出した。

以上の解析から得られた結果や各章で議論した内容をもとに、最後に形態多様化のメカニズムに関して総合考察で議論する。

第 1 章

鳥類の四肢骨格に見られる形態的特徴

四肢とは脊椎動物のうち四足動物がもつ有対付属運動器官であり、形態が機能に直結するという性質をもつ。したがって、生息環境や生活様式に応じて、四肢は多様な形態をとる。このような理由から、四肢は形態形成に限らずその多様化機構、さらには動物種間の系統関係を解析するための優れたモデルとしてしばしば用いられる。

四足動物の中でも、鳥類の四肢は特徴的な形態を示す。最も顕著な例は、その形態的特徴から翼と称される前肢であろう。翼を形づくる3本指の骨格と飛行のための羽毛には“鳥らしさ”が良く表れている。しかし、この例以外にも鳥類の四肢形態に見られる特徴は数多くある。第1章では、特に骨格形態に焦点を絞り、四足動物全体に見られる特徴との比較を交え、鳥類の特徴を概説する。

鳥類の四肢に特徴的な骨格パターン

四肢骨格形態の大部分は胚発生中に形成されるが、ここでは成鳥、すなわち“完成形”の骨格形態について言及する。

〈四足動物の四肢骨格構造〉

四肢骨格の基本形態は四足動物間で保存されており、基部から先端部にかけて、柱脚部・軛脚部・自脚部の3領域に大別できる。柱脚部は、前肢では上腕骨、後肢では大腿骨と呼ばれる1本の長骨からなる。軛脚部は、前腕および脛を成す領域であり、それぞれ2本の長骨を含んでいる。それらは前肢では橈骨および尺骨、後肢では脛骨および腓骨と呼ばれる。自脚部は多数の骨要素からなり、さらに3つの区画（手首/足首、掌部/足底部、指）へと分けらる。指は指骨が複数連なった構造である。指骨の数は種によって様々であり、この数を前側の指から順に示したものを指式と呼ぶ。

〈鳥類の前肢の骨格形態〉

鳥類の前肢における指の本数は、基本的には3本である。この3本の指がヒトの5本の指のどれに相当するかに関しては長らく議論的となったが、現在では親指・人差し指・中指、すなわち第1、第2、第3指であると決着がついた。指式に関しては、“1-2-1”あるいは“2-2-1”である場合が多く、ニワトリは後者である。3本の中手骨と先端部側の手根骨は癒合している。第1指は最も短く、その中手骨は第2指の中手骨の基

部側と癒合しているため痕跡的である。第2指は最も発達した指であり、その後方に第3指のただ1つの指骨が存在する。手根骨の数や配置は鳥類の中でも様々であり、中手骨と癒合しているものもある。柱脚部および軀脚部における骨の数はそれぞれ1本および2本で、基本的には四足動物間でも鳥類間でも変わらないが、個々の骨要素の長さや太さには種間差が見られる。

〈鳥類の後肢の骨格形態〉

ほとんどの鳥類の後肢には第1指から第4指までの4本の指があり、指式は“2-3-4-5”であるのが一般的である。中足骨に関しては、第1指の中足骨はかなり短く、それ以外の3本は良く発達した長骨となっている。成鳥では、これら3本の中足骨は並んで癒合し1本の長骨を形成している。

鳥類の足首関節には、他の脊椎動物には見られないユニークな骨形態が見られる。そこには少なくとも3つの足根骨があるが、成鳥ではこれらの骨要素が独立して存在することはない。というのも、基部側の2つは脛骨と、先端部側の1つは中足骨と癒合しているからである。したがって、鳥類の足首の関節は、軀脚部と自脚部の境界ではなく足根骨の領域内に形成されることになる。この点は鳥類の足首に特異的に見られる特徴である。他の四足動物や鳥類の前肢では、足首関節は軀脚部と自脚部の境界に形成される。

鳥類の四肢骨格形成を担う発生メカニズム

一般的な四肢の発生メカニズムに関しては現在までに様々な事実が明らかになってきているが、前述したような鳥類に特徴的な骨格パターンの形成メカニズムについては依然として不明な点が多い。そこでこの項では、まず四肢発生の基本的なメカニズムについて記述し、その後、近年明らかとなりつつある鳥類特異的な形態形成機構についても言及する。

〈四肢発生の基本的メカニズム〉

まず初めに、一般的な四肢発生のメカニズムについて記述する。発生中の四肢原基、すなわち肢芽には2つの重要なシグナルセンターが存在する。1つは外胚葉性頂堤（apical ectodermal ridge, AER）と呼ばれる肥厚した上皮構造であり、肢芽の先端部を前後

に走るように存在する。AER の切除実験から、AER が肢芽の基部先端部軸方向の成長に必須であることが示されている。AER で発現する遺伝子は多数知られているが、その中でも *Fgf* ファミリーに属する因子が AER の機能を代替できることから、*Fgf* 遺伝子群の肢芽伸長における重要性が証明されている。基部先端部に沿ったパターンニングに関しても、AER で発現する *Fgf* 遺伝子群が不可欠であることが明らかとなっている。AER が指の本数や指骨数の決定に関与するという報告もある。しかしながら、ニワトリ後肢の第 2 指と第 4 指は同程度の長さであるにも関わらず、指骨数はそれぞれ 3 つおよび 5 つであることを考慮すると、AER の存在時間と指骨数の間に明確な相関関係があるわけではない。

2 つめのシグナルセンターは肢芽後方の間充織に存在する、極性化活性帯 (zone of polarizing activity, ZPA) と呼ばれる領域である。この領域では *Shh* が発現し、肢芽の前側に向かって SHH タンパク質が拡散していくことでモルフォゲンとしてはたらく。ZPA は四肢骨格の前後軸に沿ったパターン形成に必須の役割を果たすことが証明されている。ZPA と AER の間にはポジティブフィードバックループが存在し、このはたらきが肢芽の継続的伸長に必須である。このフィードバックループの下流では *Hox* 遺伝子群が発現し、前後軸の極性や指の個性の決定に関与する。

Hox はホメオボックス型転写因子であり、脊椎動物の骨格形態の決定に関しては最も良く解析が進められているものの 1 つである。椎骨の形態は発現する *Hox* の組合せによって決定される。同様に、四肢骨格の各要素も肢芽発生初期に発現する *Hox* の組合せによって指定されると言われている。このような *Hox* 遺伝子群の発現の組合せを *Hox code* といい、四足動物間で広く保存されている。しかしながら、単純な *Hox code* だけでは骨格形態の違いを完全に説明することはできない。*Hox* 遺伝子群の発現の時間的な違いも形態差の創出に寄与していることが明らかになりつつあるが、その詳細については解析が待たれている。

〈鳥類特異的な四肢骨格形態を生み出すメカニズム〉

鳥類特異的な四肢骨格の形成要因としては、鳥類への進化の過程で、前述した一般的な四肢発生のメカニズムに変化が生じたことが考えられる。ここでは、鳥類に特徴的な 3 本指の前肢（翼）の指の個性の決定に関わる分子メカニズムについて論じる。後肢については、その特徴的な骨格形態の発生過程を主に述べる。

①鳥類の指の個性を生み出す発生メカニズム

Shh 遺伝子の発現と SHH タンパク質の拡散は、指の個性の指定に重要な役割を果たす。一方で、指そのものの形成には *Shh* シグナルは機能していない。指を形成すること、指の本数を決定すること、そして指の個性を決定することにはそれぞれ別のメカニズムがはたらいっているようである。これら各側面の違いの総和が、四足動物の指の多様な形態をもたらしているものと予想される。

マウスを用いた解析から、その 5 本の指の個性のつくられ方が明瞭に示されている。第 1 指は *Shh* シグナルに依存せずに形成される。第 2 指および第 3 指は ZPA の外側で指定を受け、より高濃度の SHH を受け取った細胞が第 3 指を形成する。第 4 指および第 5 指は、ZPA の領域内で指定を受け、*Shh* を発現した細胞自身がこれら 2 本の指を形成する。より長時間 *Shh* を発現した細胞が第 5 指を形成すると考えられている。

このメカニズムをもとにして、ニワトリの前肢の 3 本指がマウスの 5 本指のどれに相当するかについて言及することができる。最も前側の指については、この領域の遺伝子発現のプロファイリングや ZPA 移植実験の結果から、第 1 指に相当することが示されている。2 番目と 3 番目の指は、それぞれ“低濃度および高濃度の SHH”あるいは“少数および多数の ZPA 細胞”によって新規に誘導することができる。さらに、最も後ろ側の 3 番目の指が指定を受ける際、その細胞は ZPA の外側に存在する。これらの解析結果をまとめると、ニワトリ前肢の 3 本指はマウスの第 1、第 2、第 3 指に相当すると結論付けられる。

②鳥類の後肢に見られる特徴的な発生様式

鳥類の後肢にある 4 本の指はそれぞれ異なる数の指骨からなる。指骨の数の決定には、指間部における *Bmp* シグナル活性が重要な役割を果たすことが示されている。指骨の数の種間差も同様なメカニズムによって決定されるものと予想されるが、*Bmp* 活性の違いが生み出されるメカニズムについては不明である。各々の指骨の長さは指ごとに異なっているが、その違いは 1 本の指の中にも見ることができる。指が形成される際、指骨は軟骨原基の分節によって形づくられるが、1 本の長い軟骨が同時に複数に分かれるわけではなく、基部から先端部にかけて順番に付加されるように形成されていく。最も基部側の指骨のでき始めは指ごとに異なっており、指ごとの指骨の数も異なっているが、末節の指骨ができるタイミングはほぼ同時である。各指骨の長さの違いは軟骨原基の分節の段階で既に現れており、このことは形成の初期段階での長さが最終的な長さのある程度反映してい

ることを意味している。

指骨の数と長さがいかにして決定されるかということは、関節がいくつどの程度の間隔で形成されるかに依存する。関節の形成機構についてはこれまでに複数の報告がある。例えば、初期の関節マーカー遺伝子 *Gdf5* には軟骨組織を増大させるはたらきがあり、予定関節領域において *Gdf5* が発現することでその周辺に新たに関節が形成されるのを抑制し、これにより関節間の距離が決定されると考えられている。*Wnt9a* も関節マーカー遺伝子であるが、これは *Gdf5* の発現を誘導する機能をもつ。また、関節形成領域周辺における *Bmp* 活性の適切な制御が関節形成に重要であることも示されている。*AER* も指骨の数の決定に関与することは前述の通りである。

成鳥の後肢では平行に並んだ3本の中足骨が癒合して1本の長骨を成しているが、これらの中足骨が初めから平行に発生するわけではない。肢芽の発生中、中足骨が軟骨原基として現れるときは放射状に広がるように配置しているが、その後急速に成長し平行に再配置する。足根骨に関しては、足首の関節が軀脚部と自脚部の境界ではなく基部側と先端部側の足根骨の境界に形成されることは既述したが、ここに *Hox code* の概念を適用すると興味深い現象が見えてくる。一般的に、軀脚部と自脚部の形成時期に、*Hoxa11* と *Hoxa13* は互いに重なり合わずに発現しており、それぞれの発現領域内から軀脚部と自脚部の骨格要素が形成される。ニワトリの後肢では、後に軀脚部と癒合する2つの基部側足根骨は *Hoxa11* ではなく *Hoxa13* を発現する。すなわち、*Hoxa11/a13* の発現境界は足首の関節部位とは一致しておらず、軀脚部/自脚部の境界と一致していることになる。この特徴はニワトリの前肢やマウスの四肢には見られない、ニワトリ後肢特異的なものである。

最後に、鳥類後肢の軀脚部領域の2本の骨格要素の発生過程について記述する。鳥類では脛骨と腓骨の間にはかなりの形態差があり、腓骨が脛骨に比べて細く短い形態をとっているが、この違いは発生の初期からあるわけではない。軟骨原基が現れた直後は2つの原基の間に大きな違いはないが、その後2つの軟骨要素間での違いが徐々に顕著になっていく。腓骨の遠位端が失われた結果、このような形態差が生まれたとの報告がある。脛骨腓骨間での間充細胞の取り合いや、軟骨細胞の成長度合いの違い、そして軟骨形成と骨形成の程度の違いが、両者の形態差の一因となっているようだが、この上流で機能している分子メカニズムには不明な点が多く、唯一 *Hox* 遺伝子群の関与が示唆されているにとどまっている。

以上のように、鳥類の骨格形態には他の四足動物と共通のものと鳥類特異的なものの両方がある。中にはとりわけユニークな形態を呈するものもあるが、そのような形態であっても、四足動物が一般的にもつ共通のメカニズムが進化の過程において変化したことが原因となっている、と考えるのが合理的であろう。しかしながら、鳥類の形態や発生メカニズムだけを解析しては、それが四足動物共通のものなのか鳥類特異的なものなのかを推測することはできない。そのためには他の動物種との比較解析が必須になる。発現の時間・空間・量的な違いの検証に関しては、より詳細な解析が必要となる。なおかつこの違いを形態の違いに結びつけるのであれば、鳥類が示す形態のうち鳥類特異的なものとそうでないものを、その形態の形成時期も含め、把握しておく必要がある。本論文の第2章および第3章ではこの点に着目しつつ、異なる視点から形態の多様性創出について論じる。

第 2 章

四肢骨格の形態形成における転写因子 $AP-2\beta$ の機能

序論

四肢の中でも自脚部は、複雑かつ種間多様性が現れやすい領域である。この特徴は、形態差の形成機構を研究するにあたって有用な性質となるが、本研究においては特に指骨格の長さや数の違いに着目した。これらの制御に AER が関与することは既に述べたが、骨格形成の場において AER 依存的に発現し、指の形態形成を制御するような転写因子はほとんど知られていない。そこで、指形態の多様化機構を理解するため、その基礎となる分子メカニズムを担う候補転写因子の特定を試みた。

候補転写因子を探し出すため Char syndrome と呼ばれるヒトの遺伝病に着目した。なぜなら、この遺伝病の症状の 1 つに前肢の指骨格の短縮と消失があるからである。Char syndrome の原因遺伝子としては転写因子 *AP-2 β* (*Tfap2b*) が特定されている。通常、*AP-2 β* は二量体を形成することで DNA に結合し、標的遺伝子の転写を促進する。Char syndrome の患者の場合、単一の塩基置換によって二量体は形成されるが DNA 結合能を欠くような dominant negative 型 *AP-2 β* が産生され、それが発症原因となることが多い。*AP-2 β* をノックアウトしたマウスでは指骨格の低形成は見られず、第 5 指のさらに後方に非常に小さな指状の骨組織が観察される。マウス胚では、*AP-2 β* は四肢発生初期においては肢芽の後方で発現しており、発生の進行とともに前方へと拡大する。指形成時には、第 1 指を除く 4 本の指で発現する。マウスの指の中では第 1 指が極端に短いため、一見すると *AP-2 β* の発現パターンと指の長さとの間に相関関係があることが予想される。しかしながら、第 1 指は Shh シグナル非依存的に形成されるため、単に Shh シグナルの下流で *AP-2 β* が発現している可能性もある。また、*Shh* と *AP-2 β* の初期発現領域が類似していることや *Shh* ノックアウトマウスでは *AP-2 β* の発現量が低下すること、これら 2 遺伝子間の相互作用を強く示唆している。さらに、Char syndrome で見られる指の形成不全を考慮すると、*AP-2 β* が指の形態形成に寄与することが予想されるが、Char syndrome の他の症状の影響を介した二次的な影響がある可能性も否定できない。

本研究では、指形態の多様化機構を理解する上での基礎となる分子メカニズムを理解することを目的とし、*AP-2 β* が指の形態形成に直接的に関与するかどうかを検証した。また、*AP-2 β* の発現制御に関する解析や、複数の動物胚の肢芽における *AP-2 β* の発現状態の比較解析の結果から、四肢骨格の形態形成と多様性形成における *AP-2 β* の機能を考察した。

結果

***AP-2 β* は自脚部骨格の正常発生に必須である**

まず *AP-2 β* が直接的に四肢発生に関与するかを検証した。Char syndrome の原因となる変異のうち A264D と R289C に着目し、これと同等な点突然変異を施した dominant negative 型 *AP-2 β* を強制発現させる実験をニワトリ胚でおこなった。この実験では RCAS レトロウイルスを用いて、st.21 前後のニワトリ胚の後肢芽先端部 AER 直下に各 dominant negative 型 *AP-2 β* を導入した。その結果、いずれの変異を導入した場合でも自脚部骨格の短縮、消失、癒合など様々な表現型が現れた。サンプルの中には、後方の指の短縮や指骨数の減少といった、Char syndrome の症状と類似した表現型を示すものもあった。また、指の中でも第 1 指および第 1 中足骨では顕著な短縮は見られなかった。

***AP-2 β* の発現時間の長さと指の長さの間には相関関係がある**

次に、*AP-2 β* の発現解析 (whole-mount *in situ* hybridization) をおこなった。ニワトリの四肢発生の初期では、前肢芽と後肢芽のいずれにおいても肢芽の後方で発現が確認された。その後、発現は肢芽の先端部全体に拡大した。さらに後の発生段階では、長い指の形成領域では発現が維持されていたが、短い指の形成領域では発現の消失や減少が見られた。異なる指形態を示すマウスとヤモリの前肢においても同様な解析をおこなった結果、*AP-2 β* の発現時間と指の長さとの相関関係は、解析した 3 種の動物の 4 つの肢芽全てにおいて当てはまることが示された。

***AP-2 β* の発現は AER からの Fgf シグナルによって維持される**

上の結果から、*AP-2 β* を発現する時間が長いほど長い指が形成されると予想された。そこでまず、指の長さの制御に中心的な役割を果たす AER との関係を調査した。指形成時期における AER の存在箇所と *AP-2 β* の発現領域を比較したところ、AER が存在する直下の間充織特異的に *AP-2 β* の強い発現が見られた。また、*AP-2 β* の発現領域では軟骨分化マーカー *Agc1* は発現していなかった。

AER の存在と *AP-2 β* 発現の間の因果関係を明らかにするため、AER 切除をおこなった際の *AP-2 β* の発現状態の変化を調べた。後肢芽の AER を切除すると、その後 *AP-2 β* の発現は完全に消失した。また、この発現消失は FGF8 や FGF4 でレスキューされた。こ

これらの結果から、AER から分泌される FGF タンパク質が *AP-2 β* の発現維持に必要であることがわかる。しかしながら、Fgf シグナルが直接 *AP-2 β* の発現を維持しているかどうかは、この結果だけでは示されない。*Shh* の発現を介して *AP-2 β* の発現が維持されている可能性も考えられる。そこで、AER 切除後に SHH タンパク質を作用させる実験をおこなったが、*AP-2 β* の発現は全くレスキューされなかった。逆に、AER を切除せずに Shh シグナルを阻害する実験もおこなった。Shh シグナルの阻害剤 cyclopamine を投与し、*AP-2 β* の発現変化を調べると、わずかな発現の低下が見られた。したがって、*AP-2 β* は主に AER からの Fgf シグナルに応答して発現が維持されていることが示された。

また、*Shh* が *AP-2 β* の発現の誘導に関与する可能性を検討した。AER を切除しない状態で肢芽の前側の AER 直下に（つまり異所的に）SHH タンパク質を作用させ、その後 *AP-2 β* の発現状態を調べた。すると、*AP-2 β* の異所的な発現が見られた。FGF8 および FGF4 を同様に肢芽前側 AER 直下に作用させた場合は、このような異所的発現は見られなかった。一方、AER を切除した上で SHH を肢芽の前側に添加した場合は、*AP-2 β* の異所的発現は見られなかった。さらに、SHH とともに FGF8 を添加することで AER の機能を代替することを試みたが、この場合も *AP-2 β* の発現は観察されなかった。したがって、*AP-2 β* の異所的発現は、ZPA-AER 間で見られるようなポジティブフィードバックループが新たに形成された結果であると考えられる。

***AP-2 β* の過剰発現は指の過剰な伸長をもたらさない**

AER からの FGF シグナルを受けて *AP-2 β* の発現が維持されるという結果から、*AP-2 β* を強制的に発現させれば AER 消失後も指が伸長し続けると推測した。そこで、*AP-2 β* を RCAS レトロウイルスにより過剰発現させる実験をおこなった。しかしながら、形成された軟骨パターンに明瞭な変化は見られなかった。そこで constitutively active 型の *VP16-AP-2 β* を導入する実験を次に試みた。その結果、骨格の伸長ではなく短縮や消失が観察された。特に第 1 指や第 1 中足骨の低形成が顕著であった。以上の結果から、*AP-2 β* の機能亢進は指の伸長ではなく短縮をもたらすことがわかる。

***AP-2 β* と *AP-2 α* は四肢発生において異なる機能を果たす**

次に *AP-2 β* が他の AP-2 ファミリーのメンバーとヘテロダイマーを形成することで機能を発揮する可能性に着目した。発現解析の結果から、*AP-2 α* と *AP-2 β* がヘテロダイ

マーを形成している可能性が示唆されたため、RCAS レトロウイルスを用いて両者を同時に強制発現させる実験をおこなった。その結果、軀脚部骨格における顕著な短縮が観察された。*AP-2 α* 単独の強制発現実験をおこなった場合も同様な表現型が得られたが、その頻度・程度ともに *AP-2 β* と *AP-2 α* の同時強制発現よりも小さいものであった。*AP-2 β* 単独の強制発現では骨格形態の変化は見られなかったことを加味すると、*AP-2 β* と *AP-2 α* が果たす機能は異なっている可能性がある。

考察

Char syndrome と $AP-2\beta$ の関係

本研究では、ヒトの遺伝病 Char syndrome の症状とその原因遺伝子 $AP-2\beta$ に着目し、ニワトリ胚を用いて実験的にこの遺伝子と指の形態形成の関連を調査した。Char syndrome の四肢でみられる症状と、 $AP-2\beta$ ノックアウトマウスが示す表現型の間には齟齬があった。本研究では、ノックアウトマウスのような “null mutant” ではなく、dominant negative 型 $AP-2\beta$ を用いてニワトリ胚での解析をおこなった。その結果、自脚部骨格の短縮や消失などの Char syndrome で見られる症状と類似した表現型が得られた。したがって、Char syndrome の四肢形態異常は、他の組織・器官における $AP-2\beta$ の機能不全を介した二次的な影響によるものではなく、 $AP-2\beta$ が直接的に四肢の形態形成に関与していることが考えられる。また、AP-2 ファミリーのメンバーはダイマーを形成して機能すること、肢芽では $AP-2\alpha$ と $AP-2\beta$ の他に $AP-2\gamma$ も発現していること、そして dominant negative 型 $AP-2\beta$ は全ての AP-2 ファミリーのメンバーの機能を同時に阻害しうることを合わせて考えると、Char syndrome および dominant negative 型 $AP-2\beta$ を強制発現した場合において、全ての $AP-2$ 遺伝子群の機能が抑制されており、その結果 $AP-2\beta$ のノックアウトマウスでは見られない四肢骨格の形成異常が生じると推測される。

四肢の骨格形成における $AP-2\beta$ の機能

$AP-2\beta$ の発現時間の長さと指の長さとの間に相関関係があったことや、AER 依存的に $AP-2\beta$ の発現が維持されていることから、この遺伝子が指の長さの制御に関与することが考えられる。しかしながら、 $AP-2\beta$ の機能亢進実験では指の伸長ではなく短縮が見られた。この結果を踏まえ、正常な四肢骨格の形態形成で要求される $AP-2\beta$ の発現動態や機能について考察する。

$AP-2\beta$ の機能を阻害した場合は、内在性 $AP-2\beta$ の発現時間の長い指で強い表現型が観察された。逆に機能を亢進した場合は、 $AP-2\beta$ の発現消失が早期に起こる第1指に強い表現型が生じた。したがって、それぞれの指において $AP-2\beta$ の発現時間が適切に制御されることが必要となると考察できる。

AER からの Fgf シグナルが $AP-2\beta$ の発現を維持しており、また AER 消失のタイミングに合わせて $AP-2\beta$ の発現も低下することから、この“適切な”発現時間を規定する

ものとして AER からの Fgf シグナルが挙げられる。このシグナルを受け取る直下の間充織では、指の伸長に必要な全てのプログラムが動くことが推測されるが、*AP-2β* の発現もこのプログラムの一部であることが考えられる。AER の無い状態、すなわち必要な他の因子の全てがそろっていない状態で *AP-2β* を機能させると、骨格の短縮や欠損が生じてしまうのかもしれない。他の必要因子が存在する期間にだけ *AP-2β* が機能することが、正常な指の形成に必須なのであろう。

本研究では、*AP-2α* と *AP-2β* を同時に強制発現させた場合の四肢骨格形成に与える影響も解析したが、この場合は軀脚部の重篤な短縮が生じた。*AP-2β* 単独の過剰発現ではこのような変化は観察されなかったことから、軀脚部の短縮には *AP-2α/AP-2β* のヘテロダイマーが寄与したと推測できる。*AP-2α* のみを強制発現させた場合は、短縮の頻度・程度ともに *AP-2α/AP-2β* 二重強制発現に比べて軽度であったため、やはりヘテロダイマーの影響がより大きいものと予想される。通常発生時における *AP-2α* と *AP-2β* の両者の発現状態を考慮すると、本来このヘテロダイマーが存在しない軀脚部領域では重篤な表現型がもたらされるのではないかと考えられる。

一般的に AP-2 ファミリーのメンバーは、細胞の増殖と分化を制御することが示されている。肢芽における *AP-2β* の発現領域が、増殖活性と未分化性の高い領域とおおよそ重複していることを合わせて考えると、*AP-2β* は肢芽先端部においても同様な機能を有しており、これにより四肢が伸長すると考えることができる。通常発生時において、*AP-2β* の発現領域では軟骨マーカー *Agc1* が発現していなかったことは、*AP-2β* が肢芽において細胞の未分化性を維持する機能をもつことを支持している。

***AP-2β* の発現と AER および ZPA との関係**

本研究により、*AP-2β* の発現が AER からの Fgf シグナルによって維持されていることが示されたが、同時に *Shh* も *AP-2β* の発現制御に関わることも明らかとなった。まず、肢芽から AER を切除すると、*AP-2β* の発現消失に加え *Shh* の発現消失も見られた。また、いずれの発現消失も FGF8 の添加によってレスキューされたが、SHH の添加では *AP-2β* の発現はレスキューされなかった。この結果から、*AP-2β* の発現維持には *Shh* シグナルだけでは不十分であることがわかる。*Shh* シグナルを遮断した場合に *AP-2β* の若干の発現低下が見られたことや、*Shh* ノックアウトマウスでは AER にける *Fgf4* や *Fgf8* の発現が低下することを考慮すると、*Shh* は ZPA-AER のポジティブフィードバックループを介して、間接

的に *AP-2 β* の発現を制御していると考えられる。指の形成時期では *Shh* の発現はかなり低下しているため、この時期の *AP-2 β* の発現は AER からの Fgf シグナルに大きく依存していると考えられる。

一方、AER を切除せずに SHH を肢芽の前側に作用させると異所的な *AP-2 β* の発現が生じたことは、*Shh* が *AP-2 β* の発現誘導に関与することを示唆している。このような実験操作をおこなうと、*Fgf8* の発現が前方へと拡大し、本来 AER の後ろ側でのみ発現する *Fgf4* が前側でも発現するようになるが、FGF8 および FGF4 を肢芽の前側の AER 直下に作用させた場合には *AP-2 β* の異所的発現は誘導されなかった。したがって、*AP-2 β* の発現誘導には *Shh* シグナルそのものが必要であると考えられる。また、AER を切除した上で SHH を肢芽の前側に作用させた場合は *AP-2 β* の異所的発現は観察されず、さらに AER の機能を FGF8 の添加で代替した場合でも *AP-2 β* の異所的発現は見られなかった。したがって、*AP-2 β* の発現を誘導するには ZPA-AER 間で見られるような継続的なポジティブフィードバックループが形成されることが必要であると考えられる。

指の長さの制御メカニズムと多様化機構

本研究により、指の形態形成を制御する転写因子として *AP-2 β* が特定された。指の骨格を形成する間充細胞の挙動は骨格のパターニングに直結するが、この細胞で *AP-2 β* が正常に機能することが指の形態形成に必須であることが示された。最後に、*AP-2 β* の機能の仕方の違いが形態多様性を生み出すかどうかについて考察する。

まず、*AP-2 β* の発現時間の長さと形成される指の長さの間に相関関係が見られたという結果は、この遺伝子の発現差が指の長さの多様性形成に関与する可能性を予想させるものである。一方で、*AP-2 β* の機能亢進は指の伸長をもたらさず、むしろ AER からの Fgf シグナルの下流で機能する因子の 1 つである可能性がある。したがって、AER の存在期間の差異が指の長さの多様性形成をもたらすとの見方が合理的だろう。

また、今回の解析結果からは、指骨数の違いと *AP-2 β* の発現状態の違いに相関関係は見出されなかった。しかしながら、*AP-2 β* 単独の強制発現、*VP16-AP-2 β* の強制発現、*AP-2 β* と *AP-2 α* の二重強制発現の結果が全て異なっていた。すなわち、*AP-2 β* の作用の仕方の微妙な差によってはたらきが容易に変化することが予想され、その違いによって指骨数の差がもたらされているのかもしれない。*AP-2 β* とは別の分子がこの過程に関与する可能性も十分に考えられる。

本研究では四肢発生における *AP-2 β* の詳細な機能を解明するには至らなかったが、この遺伝子が指形態の多様性に関与する可能性を示すことはできた。ただし実際に *AP-2 β* が指形態の多様性に関与するとしたら、それは Char syndrome のように分子機能を変更するようなコーディング配列内の突然変異によるものというよりは、遺伝子の発現時間や発現量の多様化が重要となると考えられる。そのような発現制御を担うものとしては、遺伝子の調節領域（シス配列）が挙げられる。今後さらに解析が進むことで指形態の形成機構が明らかになり、その多様化機構についても重要な洞察を与えてくれることに期待したい。

第 3 章

鳥類の形態的特徴を生み出すゲノム配列の探索

序論

第2章では、同じ遺伝子を使いながらもその発現の時空間的な差異を生み出すことで、四肢形態の種間差や多様性が創出される可能性の一例を議論した。第3章では、遺伝子の時空間的な発現制御を担うシス配列（特にエンハンサー）に着目し、その活性の違いにより形態差が生み出される可能性に迫った。

特定の時期や領域におけるある遺伝子の発現が重要であれば、そのエンハンサー配列は高い種間保存性を示す。したがって、エンハンサー配列の候補を選出する際、複数種のゲノム配列を比較することが常套手段となっている。しかし、多様な形態を示す複数の種間で広く保存された配列は、これらの種間で“共通する”遺伝子発現をもたらすことが予想され、したがって形態の“違い”の原因を追及するためにこの理屈を適用することは一見有効でない。そこで本研究では、互いに類似した形態を示す種からなる、鳥類という1つの系統に焦点を当て、その特徴の創出には鳥類特異的に保存されたエンハンサー配列が関与することを予想し、解析をおこなった。

この仮説を検証するためには、何種類もの鳥類種のゲノム情報が必要になるが、中国の Beijing Genomics Institute (BGI) -Shenzhen の Guojie Zhang らの研究チームにより新たに 47 種の鳥類ゲノムが解読された。これによりほぼ全ての鳥類内の“目 (order)”が網羅され、鳥類内での比較ゲノム解析を高い信頼性をもって進めることが可能となった。

本研究第3章の内容は BGI-Shenzhen の Zhang のグループとの共同研究としておこなわれた。鳥類特異的ゲノム配列が鳥類特異的形態をもたらすという可能性の検証を目的とし、ドライ解析を Zhang らが、ウェット解析を私がおこなった。これらの解析を通じて、鳥類特異的な四肢形態を生み出さる候補配列がいくつか特定された。

結果

鳥類に特異的なゲノム配列の抽出

この項で記述する解析は全て Zhang らによるものである。ここでは解析手法や得られた結果の詳細を割愛し、要点のみを記述する。

本研究では、「鳥類特異的なゲノム配列が鳥類特異的な遺伝子発現をもたらし、その遺伝子発現が見られる領域に鳥類特異的な形態が生じる」という仮説を検証するため、鳥類特異的なゲノム配列の中から、四肢において鳥類特異的な遺伝子発現をもたらすものを探索した。

鳥類特異的なゲノム配列の候補を選出するため、まず鳥類間での比較により高度に保存されている配列（highly conserved element, HCE）を特定した。HCE は主に、遺伝子間領域、イントロン、コーディング領域に存在していることが判明した。この中から他の脊椎動物にも保存されているものを排除するために、他の脊椎動物 9 種とも比較し、鳥類特異的 HCE（avian specific HCE, AS-HCE）を特定した。AS-HCE のほぼ全ては、ゲノム上の遺伝子間領域かイントロンに存在しており、コーディング領域に存在するものはほとんどなかった。したがって、AS-HCE はエンハンサーとしての機能をもつ可能性が考えられた。なお AS-HCE は、鳥類にのみ存在するものと、他の脊椎動物にも orthologous な配列はあるが鳥類間での保存度が特異的に高いものの 2 種類に分けられる。以上の解析結果を受け、以降の解析では、「鳥類特異的遺伝子発現をもたらす鳥類特異的なゲノム配列のスクリーニング」をおこなった。特に、四肢に見られる鳥類の特徴との関連を見出すため、これらの形態的特徴の多くが形成される胚発生期に焦点を当てた。

AS-HCE の標的となる候補遺伝子の選出

AS-HCE がエンハンサーとして機能し、標的遺伝子の鳥類特異的発現をもたらしているという可能性を示すために、AS-HCE の直近の遺伝子の発現を鳥類とそれ以外の種の間で比較した。AS-HCE が遠位エンハンサーとしてはたらく可能性は、本研究では考慮していない。AS-HCE の直近遺伝子の中でも、特に AS-HCE の鳥類間での保存度が高く、また配列長の長いものから順に 100 個選出し、発現解析の対象とした。

鳥類特異的発現を示す遺伝子のスクリーニング

この 100 遺伝子の中から鳥類特異的な発現を示すものを探索するため、①ニワトリの発生中の肢芽において顕著な発現が見られるものや、領域あるいは時期特異性が見られるものを中心的にスクリーニングし、②さらにその中からマウスの肢芽では異なる発現パターンを示すものをスクリーニング、③そして最後に鳥類により系統関係の近いヤモリでも発現を比較した。スクリーニングの手法としては、いずれの種においても四肢発生の初期段階から指の形成期にかけての 4 段階を対象とし *whole-mount in situ hybridization* を実施した。最終的に、鳥類特異的発現を示す遺伝子として、*Inadl*、*Sim1*、*Dpyd*、*Map3k7*、*Pax9* および *Boc* の 6 つが特定された。

中でも *Pax9* と *Sim1* は興味深い発現を示した。*Pax9* は、いずれの種においても第 1 指の付け根において発現していたが、ニワトリ前肢では明らかに弱い発現が見られた。したがって、ニワトリ前肢の第 1 指の特徴的な形態との関連が予想された。*Sim1* に関しては、ニワトリの指形成期の前肢において、風切り羽の形成領域（肢芽の後ろ側、肘付近から指先にかけて）に特異的に一直線状に発現していた。ニワトリの後肢やマウス・ヤモリの四肢では、対応する領域で *Sim1* の発現は見られなかった。この *Sim1* の発現が特に興味深いものであったため、*section in situ hybridization* を用いて、羽芽のマーカー遺伝子の発現との比較をおこなった。その結果、*Sim1* は風切り羽の羽芽の腹側間充織に発現していることが明らかとなった。また、第 1 指の腹側の領域にも *Sim1* の発現が見られた。羽芽は一定の間隔を置いて形成されるのに対して、*Sim1* の発現は連続的であった。

考察

AS-HCE が示す特徴

鳥類間のみの比較から選出した HCE の中にはコーディング配列に分布しているものもあったが、それらのほぼ全ては他の脊椎動物でも高度に保存されていた。その一方で、AS-HCE の多くは遺伝子間領域かイントロン、すなわち遺伝子発現の制御を担いうるシス配列に存在していた。この結果は、鳥類とその他の脊椎動物の違いは、タンパク質のアミノ酸配列の違いではなく、遺伝子発現の調節配列の違いに起因していることを示唆している。これら AS-HCE の中には、鳥類への進化の過程で何らかの機能を獲得し、その後強い選択圧を受けて高度に保存されたものが含まれていると推測される。

AS-HCE のスクリーニングの評価

今回おこなったスクリーニングは、上位 100 個の AS-HCE と直近の遺伝子を対応させ、その遺伝子の発現を鳥類と他の動物種の胚の肢芽において比較することでおこなった。したがって、このストラテジーでは見落とされてしまう AS-HCE があることにも留意すべきである。例えば、他の組織や器官にも注目すれば、より多くの遺伝子が鳥類特異的発現を示すことを見出せる可能性がある。AS-HCE が遠位エンハンサーとしてはたらく可能性まで考慮すれば、より網羅的にスクリーニングをおこなうことができるだろう。加えて、今回は鳥類でのみ高度に保存されている配列に着目したが、鳥類でのみ保存度が極端に低い配列は扱っていない。このような別の基準のもとでスクリーニングをおこなえば、別の候補配列やその標的遺伝子が特定される可能性は十分に考えられる。しかしながら、四肢における鳥類特異的形態の形成要因を鳥類間でのみ高度に保存された配列として鳥類ゲノムの中に複数選出できたことに変わりはなく、本研究が一定の成果を挙げたことを示している。

鳥類特異的発現を示す遺伝子の機能

100 遺伝子のスクリーニングの結果、6 つの遺伝子が、AS-HCE の制御下で鳥類特異的発現を示す可能性のあるものとして選出できた。この要約では、その発現パターンから鳥類特異的な形態との関連が予想された *Pax9* と *Sim1* についての考察を述べる。

Pax9 に対応する AS-HCE は *Pax9* 遺伝子座のイントロン内に存在しており、その

長さは 204bp である。他の動物種にも orthologous な配列が存在する。*Pax9* は、paired-box モチーフをもつ転写因子である。肢芽における発現に関しては、マウス胚とニワトリ胚で既に記載されているが、指形成期のニワトリ前肢芽における *Pax9* の発現低下についてはわずかに触れられている程度である。このニワトリ前肢芽に特異的な発現低下は、第 1 指の特徴的な形態との関連を予想させた。*Pax9* に関しては機能解析の結果がいくつか報告されており、*Pax9* をノックアウトしたマウスでは、前肢・後肢ともに第 1 指の重複が生じる。したがって、*Pax9* が第 1 指の形成に関与することは確かなようであるが、発現消失が起こるニワトリ前肢の第 1 指の形態を考えると整合性がとれない。ただし、指形成期の発生段階でのみ発現が消失することによって、第 1 指の特徴的な形態がもたらされている可能性はある。

Sim1 に対応する AS-HCE は *Sim1* 遺伝子座のイントロン内に存在しており、その長さは 283bp である。他の動物種にも orthologous な配列が存在する。*Sim1* は basic helix-loop-helix ドメインおよび Period-Arnt-Sim ドメインを含む転写因子である。四肢発生に関しては、初期段階の肢芽において筋肉前駆細胞で発現していることが報告されている。ニワトリ胚の後期ステージにおける前肢での発現に関しては、これまでに切片上で確認されているが、切断方向が本研究と異なるため、今回見られたような一直線状の発現は確認されていない。この領域における *Sim1* の機能解析もおこなわれていない。本研究の解析から、*Sim1* が羽芽の中でも特に風切り羽の羽芽の形成位置に沿って発現することが示された。羽芽は一定の間隔を空けて形成される一方、*Sim1* の発現は連続的であった。したがって、*Sim1* の機能としては、個々の風切り羽の羽芽形成そのものというよりも、その形成位置を肢芽の後ろ側辺縁部に規定するということが推測される。一方で、風切り羽のもつ“羽軸が骨にまで達している”という特徴との関連も示唆される。*Sim1* の発現は、肘付近から指先にかけての後ろ側間充織の他に、第 1 指の後ろ側でも見られた。この領域には小翼羽という、第 1 指の指骨まで達する羽軸をもつ羽毛が形成される。したがって、*Sim1* の発現領域と、羽軸が骨にまで達する羽毛が形成される領域に関連があることがわかる。

Pax9 や *Sim1* に限らず、他の 4 つの候補遺伝子のいずれに関しても四肢発生における詳細な機能が不明であるため、四肢形態との明確な因果関係は見出せてはいない。しかしながら、本研究により、AS-HCE の制御下で鳥類特異的な発現を示す候補遺伝子を特定する、という段階までは到達された。今後は、AS-HCE の機能解析に加え、個々の標的遺伝子の機能を理解することが、“鳥類特異的なゲノム配列”、“鳥類特異的な遺伝子発現”、“鳥類

特異的形態”の三者を一直線で結ぶために必要となるだろう。

総合考察

本研究では、ある 1 つの転写因子がもつ機能の観点と、鳥類特異的に保存されたゲノム配列による遺伝子発現制御の観点から、四肢における形態の多様性創出メカニズムの解明を目指した。

第 2 章では *AP-2 β* という転写因子に注目し、指形態の多様化機構に迫った。*AP-2 β* の発現パターンには明確な種間差があり、発現時間の長さと指の長さの間の相関関係が見られた。この結果は、*AP-2 β* の発現変化をもたらす調節機構の違いが種間差や形態差を生み出すことを示唆している。*AP-2 β* は数ある遺伝子の一例であり、実際には複数の遺伝子が調節機構の違いの影響を受けて種によって異なる発現を示しており、それらの結果の総和が指形態の種間差に寄与しているのだろう。

このような調節機構の違いをゲノム配列の中に求めたのが第 3 章の研究である。鳥類という一集団に注目し、鳥類特有の形態の創出要因が鳥類間でのみ高度に保存されているシス配列にあるという仮説を立て、これを検証した。その結果、鳥類特異的なシス配列の制御のもとで鳥類特異的な発現を示す遺伝子を複数特定できた。さらなる解析の余地は残されているものの、シス配列の保存性と形態の保存性を結ぶ 1 つの例が示されたことになる。逆に考えると、シス配列の多様化が形態の多様化をもたらすということになり、この考察は“序論”で言及した内容と良く合致する。

ここでさらに必要となるのが第 1 章や第 2 章の視点である。上で“解析の余地が残されている”と述べたが、その 1 つが各形態の発生過程と個々の遺伝子が果たす機能に関してである。第 2 章では、形態多様化を評価するためには、その基礎となる分子メカニズムを理解することが重要であると、改めて示された。こうすることにより初めて、“ゲノム配列”と“発生過程における遺伝子の機能”と“形態”が包括的に理解されるだろう。

本研究では、形態多様化のメカニズムを理解するために、四肢に見られる形態を対象として解析をおこなった。しかしながら、上で議論したような本研究が提示する結論は、決して四肢形態に限定されるものではない。他の器官に見られる形態の種間差にも同様なことが当てはまるだろうし、さらには種間ではなく種内での差にも適用されるはずである。本研究により、形態多様化の基本原則が具体的にどのように機能するかの一例が示されたと結論付けて良いだろう。